

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : **09-121899**

(43) Date of publication of application : **13.05.1997**

(51) Int.Cl. **C12Q 1/68**

C07H 21/04

C12M 1/00

C12N 15/09

// B01L 7/00

(21) Application number : **08-246629**

(71) Applicant : **BOEHRINGER MANNHEIM
GMBH**

(22) Date of filing : **18.09.1996**

(72) Inventor : **MACHO HEINZ
BIENHAUS GERHARD DR**

(30) Priority

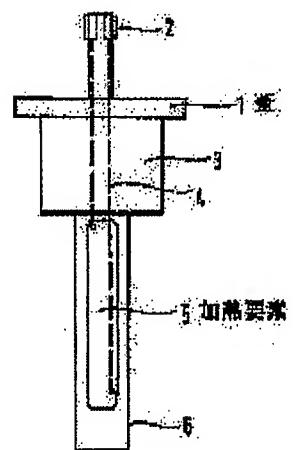
Priority number : **95 19534632** Priority date : **19.09.1995** Priority country : **DE**

(54) SYSTEM FOR CONTROLLING TEMPERATURE OF LIQUID SAMPLE

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject system capable of setting a nucleic acid-containing solution at a desired temperature regardless of the number of the operations by disposing a thermostat element and a heating element comprising the integrated element or lid of a disposable container and extended into the solution during the control of the temperature.

SOLUTION: This system for controlling the temperature of a solution containing nucleic acid comprises a thermostat element and a disposable heating element. The heating element 5 comprises the integrated element or lid 1 of a container. The lid 1 has a closed part capable of being accurately fit into the shape of the opening of the container to be sealed. The seal of the opening is extended to a plastic mount 6 for the heating element 5. Electric wires 4 for supplying an electric current to the heating element 5 can be stayed in the plastic mount 6 or the seal, and an electric contact 2 at the other ends of the wires is extended to an electric source. A temperature cycle for a temperature control treatment is executed with a cooling element and the heating element, and a nucleic acid-containing solution can be set at a desired temperature for the replication of a sequence information, etc., without relating to the number of temperature control operations.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 31.07.2003
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-121899

(43) 公開日 平成9年(1997)5月13日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 Q 1/68		9453-4B	C 12 Q 1/68	A
C 07 H 21/04			C 07 H 21/04	B
C 12 M 1/00			C 12 M 1/00	A
C 12 N 15/09	ZNA		B 01 L 7/00	
// B 01 L 7/00		9162-4B	C 12 N 15/00	Z NAA
			審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全11頁)	

(21) 出願番号 特願平8-246629

(22) 出願日 平成8年(1996)9月18日

(31) 優先権主張番号 195 34 632.7

(32) 優先日 1995年9月19日

(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 591005589

ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング

BOEHRINGER MANNHEIM
GESELLSCHAFT MIT B
ESCHRANKTER HAFTUNG
ドイツ連邦共和国、68305 マンハイム、
ザントホーファー シュトラーセ 116

(72) 発明者 ハインツ マホ

ドイツ連邦共和国、デー-64658 フィルツ、オルツシュトラーセ 42

(74) 代理人 弁理士 朝日奈 宗太 (外1名)

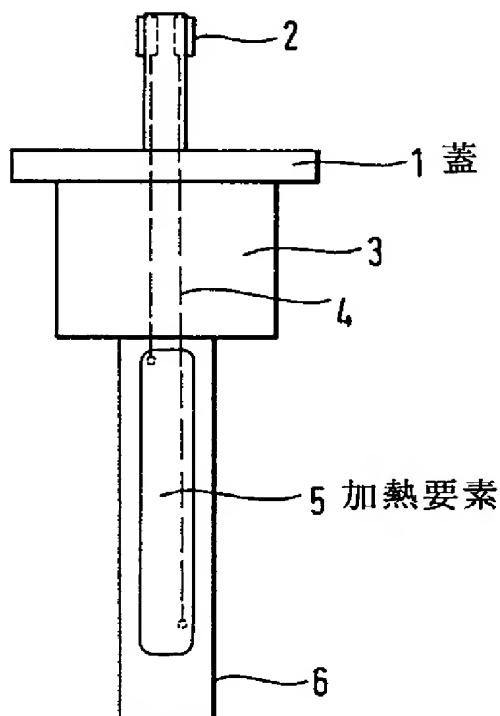
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 液体サンプルの温度調節処理のためのシステム

(57) 【要約】

【課題】 本発明のシステムによれば、温度の調節回数には関係なく、各ばあいにおいて必要とされるかまたは所望の温度を設定することが可能なシステムを提供すること。

【解決手段】 サーモスタット要素と、使い捨て可能な加熱要素とからなる、容器内の核酸を含む液体の温度調節処理のためのシステムであって、前記加熱要素が前記容器の一体要素または蓋であり、当該温度調節処理のあいだ当該液体中に延びてなることを特徴としている。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 サーモスタッフ要素と、使い捨て可能な加熱要素とからなる、容器内の核酸を含む液体の温度調節処理のためのシステムであって、前記加熱要素が前記容器の一体要素または蓋であり、当該温度調節処理のあいだ当該液体中に延びてなるシステム。

【請求項2】 冷却要素および加熱要素によって達成された、2または3以上の温度設定における液体中の核酸の処理方法であって、前記冷却要素が再使用可能なデバイスの部分であり、前記加熱要素が使い捨て可能な構成の部分であることを特徴とする処理方法。

【請求項3】 前記使い捨て可能な構成が前記容器の蓋であることを特徴とする請求項2記載の処理方法。

【請求項4】 前記加熱方法の過程で液体中に延びる加熱要素を特徴とする請求項2または3記載の処理方法。

【請求項5】 (a) 容器中に含まれるコンパートメントから、決定されるべき核酸を遊離し、(b) 前記容器中に存在する核酸に由来する配列情報を複製し、(c) 配列情報を決定することによってサンプル中の核酸を決定する方法であって、前記工程(a)と工程(b)とのあいだに前記容器から核酸が取り出されないことを特徴とする方法。

【請求項6】 配列情報の複製が温度サイクルにおいて生じることを特徴とする請求項5記載の方法。

【請求項7】 前記温度サイクルが加熱要素および冷却要素の助けにより実行され、当該加熱要素が使い捨て可能な構成であることを特徴とする請求項6記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明の主題は、核酸を含む液体の温度調節処理のためのシステム、液体サンプルの温度調節処理のための方法およびサンプル中の核酸の同定のための方法である。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 液体を一定の温度に設定することは、生物学的に活性な成分の係わりによって生じる反応にとって重要な指標である。もし温度が正しく設定されないと、反応がまったく起こらなかったり、または好ましくない程度にまで反応が起こりうる。このことは酵素が含まれる反応のばあいに、とくにあてはまる。酵素は温度依存的反応速度論を示す。そのうえさらに、たとえば相補的な核酸などの生物学的に結合するパートナー間での複合体の生成が温度に依存する。核酸は融解温度より高い温度では一本鎖の形態で存在し、かつ融解温度より低い温度では二本鎖の形態で存在する。

【0003】 反応が連続的に起きる場合、異なる温度の規定(regime)を必要とし、反応媒体の温度を調節する必要がある。

【0004】 今日までこの点については、反応混合物を

含む反応容器を異なる温度を保っている各液体バスにあちこちと移送することによって達成されていた。容器内の液体がサーモスタッフ媒体中の液体の温度をえるためには、当該容器は一定期間それぞれのバスの中に入れておかなければならなかつた。所望の反応のための適切な時間の後に、液体を含む容器は他の液体バスに移送されていた。これらの操作は、作業がきわめて集中的であり、自動化が困難であった。

【0005】 ごく最近では、温度調節されるべき液を含む容器は1つの場所に限定されたままであって、当該温度調節されるべき液体の温度が調節されるというデバイスが開発されている。しかしながら、この方法では、すべての冷却剤の温度が調節されなければならないので、比較的時間がかかるという欠点がある。これは冷却方法においてとくに不利である。

【0006】 温度調節処理は核酸診断の分野でとくに用いられている。たとえば、ポリメラーゼ連鎖反応(以下、PCRという、ヨーロッパ出願公開第0201184号公報)のばあい、サーモスタッフ媒体の温度は周期的に変化する。これらの目的のために、いわゆるサーモサイクラーが記載されている(米国特許第5,038,852号明細書およびヨーロッパ出願公開第0488769号公報)。この方法のばあい、金属製であり、反応容器のためのくぼみを一体化している反応プロックが、加熱および冷却されて温度調節処理に影響を及ぼしている。

【0007】 国際公開第92/78089号パンフレットには、閉じられた循環システム中に液体反応物を含み、冷却および加熱要素を有する領域間のあちこちに液体反応物を移送するシステムが記載されている。しかしながら、この操作に要求されるシステムは複雑であり、ルーチンワークに使用するのには適していない。

【0008】 液体サンプルで行なわれる温度調節処理を実行する際(とくに、PCRのあいだ)には、水の分圧が比較的高くなる温度が用いられる。このため、反応容器の蓋上で通常液体が凝縮してくる。しかしながら、このことにより反応混合物中の反応成分の濃度が制御できなくなるという結果が生じるので、当該蓋に凝縮した液体の液滴を再蒸発させて気相にもどす目的で、加熱要素を蓋に組み込む可能性が示唆されている。しかしながら、かかる蓋の加熱器は、反応混合物には及ばない領域のみを加熱するように位置づけられる。

【0009】 本発明の目的は、液体の温度調節処理に使用するための別のシステムを提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】 本発明の主題は核酸を含む容器内の液体の温度調節処理用システムであつて、当該システムは再使用可能なサーモスタッフ要素と使い捨て可能な加熱要素とを有しており、当該加熱要素が容器または蓋と一体的に形成され、当該処理のあいだ液体中

に浸されてなるシステムである。

【0011】本発明は、液体中の核酸の処理のための方法も含み、当該処理の過程において2または3以上の設定された温度がサーモスタット要素または加熱要素を用いて達成される。ここで当該サーモスタット要素が再使用可能なデバイスの一部であり、かつ当該加熱要素が使い捨て可能なデバイスの一部である。

【0012】本発明のシステムは、液体またはその一部が異なる温度レベルにならなければならない方法に使用されるよう意図されている。これは、たとえば化学反応または好ましくは酵素反応などの液体中で行なうべき反応が一定の温度でのみ生じるかまたは好都合に生じるべしに必要である。さらに温度に敏感に起こる反応としては、適切な融解温度(T_m)より高い温度まで液体を加温するかまたはその温度でインキュベーションすることによる叙上の相補的核酸鎖の分離、および融解温度以下の温度、好ましくは融解温度以下15℃より高い温度で、たがいに実質的に相補的である核酸からハイブリッドを生成する、いわゆるハイブリダイゼーションがあげられる。上昇した温度で温度処理を必要とする他の方法は細胞をフラグメント(fragment)に分解する方法である。そのうえさらに、液体中に存在し、温度によっては失活しうる成分をターゲットとして分解するべしに、たとえば分解工程に用いられる酵素(たとえば、プロテイナーゼ)を失活させるべしに上昇した温度が用いられる。本発明のシステムによれば、温度の調節回数には関係なく、各べしにおいて必要とされるかまたは所望の温度を設定することが可能となる。それゆえ、これらの工程を連続的かつ交互に、たとえばサイクルで数回または2回以上繰り返して実行することも可能となる。

【0013】本発明の思想において、液体の温度調節処理とは、液体中で起らなければならない複数の反応が異なる温度で起りうるように液体を処理することを意味する。これは、場所依存の温度プロファイルばかりではなく時間依存の温度プロファイルをも考慮している。

【0014】異なる温度で繰り返し実行される温度処理の顕著な例は、PCRによる核酸の増幅である。この反応は現在では種々に改変された形態で専門家によって何度も記載されている。

【0015】かかる開示のうちの重要な例が米国特許第4,683,202号明細書である。PCRの本質的な特徴は、周期的な温度の規定を繰り返し実行することである。当該周期的な温度の規定は、存在しうる二本鎖の核酸を一本鎖に還元するための高温(たとえば、90~95℃)での処置、増幅される核酸配列へのプライマーのハイブリダイゼーションを促進する低温(たとえば、50~65℃)での処理およびマトリックスとして増幅される核酸を用いてプライマーの最適な伸長を助ける中間の温度(たとえば、70~75℃)における処理を含

む。

【0016】種々の温度サイクルの可能性は、たとえばヨーロッパ特許出願公開第0511712号公報において記載されている。

【0017】本発明の思想において処理に付されてもよい核酸とは、バイオポリマー、その誘導体、または塩基もしくは核酸の糖-リン酸バックボーンの修飾によりえることのできる、それらの類似物(たとえば国際公開第92/20702号パンフレットに記載のDNA、RNA、2'-アリル-RNAなど)を含む核酸塩基からなる。核酸は細胞に結合した形態で溶液中の液体に存在していてもよく、また粒子などの固体の表面に結合した形態(固定化)で存在していてもよい。

【0018】核酸は少なくとも温度調節処理の過程で行なわれる工程のあいだ溶媒和の状態で存在するのが好ましい。逆に、たとえば固定化したプローブを用いて表面に結合させた核酸を加熱することにより、固定化された核酸を溶液中に入れることができる。

【0019】核酸を含むすべての液体(たとえば、もとの環境から直接採取されたサンプル)は、原則としてとくに適切な液体である。しかしながら、たとえば、分析方法に影響があるかもしれないサンプル成分の除去のための工程、高粘度のサンプルの液化、サンプルの濃縮または希釈、溶解工程、さらにはもとのサンプルからの核酸の単離(あらかじめ行なわれる精製)などの一定量の調製を行なった液体がとくに適している。

【0020】血液、尿、痰などの液体またはスミアもしくはスワブなどはとくに考慮されるべきである。

【0021】温度調節処理が行なわれる容器は、当該温度調節処理の過程で、その要素の一部が液体中に放出されることなく、また当該処理の過程で変形することのない材料から製造されるのが好ましい。この点において、ポリプロピレン製、ポリスチレン製などのプラスチックがとくに適している。容器の寸法は、加熱要素とともにサンプルおよび加えられてもよい試薬を収容しうるよう選択される。とくにエッペンドルフカップ(Eppendorf-cup)に由来する容器が好適であるが、このばしにカップと蓋とのあいだにはいかなる材料でも使えるので好ましい。このような容器は市場で入手することができ、射出成形により容易に製造できる。

【0022】このシステムのさらなる要素は蓋である。当該蓋は容器を閉じるために用いることができる。蓋は容器からエアゾールによる汚染物質の流入および流出を制限し、容認しうるレベル(すなわち、分析を妨げないレベル)にしうる位置になければならない。これは、容器(containment vessel)のためにすでに規定されている如き主として耐熱性材料から製造されなければならない。

【0023】サーモスタット要素は所定の温度に能動的に(actively)もたらすことを目的としてい

る。冷却要素は本発明の意味において能動的に冷却され、液体から直接的または間接的に熱を伝達する（すなわち、液体により熱交換される）ことができるものである。当該冷却要素は容器を含んでいない。本発明の第1の実施例において、冷却要素はたとえばペルチエ（P e l t i e r）要素（熱電冷凍）または冷却液体を経て冷却されうる金属ブロックである。もし金属ブロックが採用されると、容器の外部輪郭に適用できるので、好ましい。適切な適合が、容器が挿入される冷却要素内の中空の円筒状凹所をつくることによって達成される。冷却要素が容器の外部輪郭への適合が良くなれば、それだけ冷却効果が良くなる。本発明の他の実施例において、冷却要素が開口を経て容器内に突出している金属要素であることが好ましく、液体の表面下にまで達しているのが好ましい。なお、当該開口は蓋を用いて閉じることができるのが好ましい。とくにペルチエ要素を用いる冷却はこの点で好ましい。このばあい、冷却要素は、テフロン（商品名）またはポリエステル製の膜を用いて液体による汚染から保護されているのが好ましい。この膜は冷却要素の一部ではないと考えられている。なぜなら、この膜は再使用できないからである。冷却要素はウォーターバスの形をとることができる。このばあい、容器はウォーターバス内に突出している。

【0024】容器を介した液体冷却媒体からの反応混合物への熱伝達は、このばあい直接である。しかしながら、本発明の思想におけるサーモスタッフ要素は、もし液体の温度調節処理が室温より5℃だけ超える最小のしきい値(threshold)が得られることを要求するなら、加熱する容量をもつことができる。このばあい、サーモスタッフ要素から周囲への熱伝達が非常に大きいので低温しきい値の維持が熱の追加を必要とする可能性がある。しかしながら、当該プロセスの過程で達成されたサーモスタッフ要素の最小温度は常に当該プロセスのあいだに達成された加熱要素の最大温度未満である。

【0025】要素の再使用性とは、少なくとも他の1つの液体を処理するために同一の冷却要素を用いる可能性を意味するとされている。当該他の液体は第1の液体と異なる成分をもつのが好ましいので、第1の液体による追加の液体の汚染を最小にするように注意が払われなければならない。このため、冷却要素が外側から冷却する本発明の実施例は好ましい。本発明の思想における加熱要素は、能動的に加熱されることを目的としており、その熱の発生が処理に付される液体を加温するために用いられる。これはマルチコンポーネントの加熱要素を意味するとされている。この加熱要素は、金またはグラファイト要素などの金属ワイヤまたは金属箔を含むことが好ましい。かかる加熱要素は当業者には知られている。加熱の熱容量は液体の所望の温度が要求される時間内に達成されるように設計されている。さまざまな加熱要素の寸法、採用された構成の材料および給電によって達成す

ることができる。

【0026】本発明の思想において使い捨てうる要素とは、ある液体の温度調節処理の終了のち捨てられる要素を意味するとされている。独立した温度調節処理が加えられるべきさらなる液体の温度調節処理のために用いられない。かかる液体の分析において、加熱要素はその分析のち捨てられる。このため、単純な構成を有し、かつ合理的なコストで製造された加熱要素が好ましい。

10 【0027】本発明の思想において構成要素のうち一體的な要素とは、この要素から分離されうるときは、かならず加熱要素または構成要素（容器または蓋）のいずれをも破壊する要素のことである。加熱要素が容器または蓋にモールドされるばあいとくに好ましく、このばあい、射出成形プロセスのために有利である。第1実施例において加熱要素が容器内に一体化されている。加熱要素が、加熱されるべき液体と接する容器の底または容器の側壁などの受液領域に設けられることを保証するために注意が払われている、加熱要素が蓋の一體的要素である本発明の好ましい実施例において、加熱要素は蓋の内側に固着され、かつ蓋が容器上に設けられるとき当該容器内に延び（好ましくは、液体のレベルの下まで延び）るのが好ましい。加熱要素またはコネクションは、たとえば給電のために蓋の外側に延び、連結要素の使用により再使用しうるデバイスに接続されることができる。当該デバイス加熱要素に給電し、加熱容量の調節をならしめる。容器内への加熱要素の下降（d i p p i n g）は、液体が適切な熱容量を受けるようになされる。

30 【0028】本発明のシステムおよび本質的な要素（たとえば、容器、蓋、加熱要素および冷却要素）に加えて、液体の温度調節処理およびさらなる処理ステップを達成するためにより一層適した要素が組み込まれる。構成要素はとくに電気による加熱要素および冷媒による冷却要素、温度の調節のための要素、容器のための輸送ユニット、液体を容器内および容器外へピペット処理するための要素および当該システム全体を制御する要素を設けるためのものである。システムは複数の容器および蓋を組み込んでおれば数種類の液体（とくに核酸を含む液体）を直列または並列に処理するのに適しているため好ましい。

40 【0029】液体の加熱および冷却をなしうる2つのモデルがある。第1のモデルのばあい、加熱要素は間欠的に能動的になり（たとえば、ほんの数秒という短い期間加熱され）、冷却が永続的になされる。これにより、異なる連続的な温度勾配（g r a d i e n t）が液体内で設定され、冷却要素近傍の温度がほぼ一定のままであり、加熱要素に近い液体の温度が大きく変動する。そうするあいだに容器内の異なる場所で異なる反応が起きるという状況を達成することができる。たとえば、加熱要素が核酸の変性に必要な温度にまで（T m値を超えて）

7
加熱されるばあい核酸の変性だけが加熱要素の近傍で起こる。そののち変性された核酸は、他の核酸とのハイブリダイゼーションが起こりうる領域に輸送されうる。輸送は対流機構 (convection mechanism) をよって発生しうるが、拡散が好ましい。第2のとくに好ましい実施例において冷却および加熱機能は連続的に活動され、一定の状態を維持することが好ましい。このばあい充分に長い期間のあいだ安定した温度勾配が達成される。拡散および対流と液体の熱伝導容量とにより当該温度勾配が液体中で制御される。このばあいにおいても、容器内の異なる場所で異なる反応が起こるかもしれない。このモデルのばあい、それぞれの反応に関わる全成分が溶解していることが好ましい。

【0030】1つの好ましいモデルにおいて当該システムは、複数の蓋、複数の容器、加熱要素の動作のための電気エネルギーの供給および制御に活動する要素ならびに本質的にサーモスタッフされたブロックから構成されている。

【0031】サーモスタッフブロックは、プラスチック容器のための受け孔を有する金属製本体であることが好ましい。サーモスタッフされた液体（熱伝達液体、循環冷却）の使用、ペルチェ要素または他の知られたサーモスタッフ方法の採用によって必要とされるサーモスタッフ効果が与えられる。

【0032】プラスチック容器のための孔の寸法は当該プラスチック容器の外径の輪郭に正確に適合される。なぜならばサーモスタッフブロックとの直接接触が所要の有効な熱伝達に必要であるからである。

【0033】しかしながら、かかる構造上の特徴は当業者には知られている。

【0034】孔の深さは、直径に対して5:1の関係であることが好ましい。なぜならば温度勾配が良好に設定されているとき、当該システムに好ましい液体の混合が発生するからである。

【0035】温度調節処理が連続的に起こるプラスチック容器はポリプロピレンからなり、1.0mm未満の壁の厚さを有していることが好ましい（しかしながら、反応混合物の全容量に依存する）。

【0036】臨床化学および核酸診断学 (Nucleic Acid Diagnostics) における典型的な反応の実行では、通常1ml未満の容量が用いられている。射出成形プロセスを用いて製造される蓋を供えた容器の概略寸法が、8mm（内径）および40mm（高さ）である。

【0037】使い捨て可能な加熱要素は全体がプラスチックの成型体、電気コネクションおよび熱伝達フィルムからなるのが好ましい。使い捨て可能な加熱要素の寸法は反応容器の寸法と適合する。

【0038】使い捨て可能な加熱要素の好ましい実施例は予め製造されたコンタクトおよび熱伝達フィルムが蓋

およびマウントからなり射出成形によって製造されたプラスチック要素と一体化されたものである。熱伝達フィルムは、20μmの厚さの金のフィルムであることが好ましい。射出成形されたプラスチック成分はポリプロピレン製である。加熱要素の領域は60mm²であることが好ましく、当該加熱要素の下端は反応容器内で容器の底部に延びている。核酸を含む液体の温度調節処理のための叙上のシステムは、多くの方法に役立つように用いられる。

10 【0039】それゆえ本発明の目的は、冷却または加熱要素を用いて2または3以上の温度を適用する液体中の核酸の処理方法である。当該冷却要素は再使用しうるデバイスであり、当該加熱要素は使い捨て可能な構成の一部である。前記特徴はこの方法のために有効である。熱サイクル反応への本発明の方法の適用は、とくに実際的であることを証明している。かかる方法の過程で、異なる反応が異なる温度で生ずる。かかる反応は、試薬にある温度を付すことによって起こりうる。このことは、一方では叙上のように反応混合物における時間に依存して変化する温度プロファイルによって加熱ならびに、もしくは冷却容量を増加もしくは減少することによって達成されることができ、他方では、加熱領域と冷却領域とのあいだの一定の温度プロファイルを規定することによって達成されうる。

【0040】インテグレード（すなわち、中間の形態または混合された形態）は、たとえば混合物中の対流により達成されると考えられる。

【0041】本発明の方法によれば、所望の反応の反応物は連続的に異なる温度に付され、その結果、所望の反応が起こりうる、ということが重要である。全処理期間のあいだ、冷却効果がたとえば周期的な反応における冷却および加熱要領の制御によって達成されることがある。その結果、反応物は異なる反応パラメータに周期的に付され、それゆえ反応サイクルが連続的に実行される。反応混合物を比較的一定の温度勾配に付すことによって、1つの温度を有する反応混合物の第1の空間部から第2の温度を有する第2の空間部へ反応パートナーが拡散することによって容易にされた周期的な処理が生ずる。反応のうちの周期的な過程が引き続く反応に要求される如き1つの温度（たとえば、第1または第3の温度によって更新される温度）を有する空間的な容量部に拡散することによって発生する。拡散の過程は通常比較的ゆっくりと生ずるので、加熱要素と冷却要素とのあいだの温度降下が比較的短い経路に限定されるように、急な温度勾配を選択するのが好ましい。加熱要素と冷却要素とのあいだの典型的な経路の長さは数mmである。

【0042】核酸の温度調節処理のための方法の典型的な例は、核酸またはその一部分の増幅である。この一例は米国特許第4,683,202号明細書に記載されているようにPCRである。他の例はリガーゼ鎖反応であ

る。

【0043】本発明のさらなる目的は、(a) 容器中に含まれるコンパートメントから検出されるべき核酸を遊離し、(b) 容器内の核酸の存在に由来する配列情報を複製し、および(c) 配列情報を決定する工程からなるサンプル中の核酸を検出するための方法である。

【0044】なお、核酸は前記工程(a)～(b)の間に容器から取り出されない。

【0045】本発明のシステムはそのようにすることによって核酸決定の操作を著しく簡単にするために用いられることができる。液体が容器内で1つの場所から他の場所に移送されないばあい(混合操作を除いて)がとくに好ましい。

【0046】コンパートメントからの核酸の遊離は、原則的には既知の手段によって行なうことができる。通常の処理は、たとえばプロテナーゼK、界面活性剤またはアルカリなどの適切な試薬および/または熱による細胞壁の溶解からなる。ここで、コンパートメントの具体例としては細胞があげられる。

【0047】これにより核酸が溶媒和され、核酸をさらに処理する試薬に接近することができる。この工程は反応条件下およびつぎの工程(b)で化学作用を起こさない容器、たとえばプロピレン製の容器内で行なわれる。同じ容器内で核酸の存在に由来する配列情報が、たとえば遊離された核酸の一部の増幅などにより複製される。これはPCRを用いて行なわれる。

【0048】配列情報とは、決定されるべき核酸の一部分または全体であるヌクレオチド配列などの塩基配列を意味する。

【0049】もっとも、原則的には配列情報は、決定される核酸と架橋によって対となり、最終的には複製されるヌクレオチドに含まれる。これは、たとえばいわゆるシグナル増幅を用いて行なうことができる。本発明の目的のためには、工程(a)および(b)で起こる反応が同一の容器内で起こることが不可欠である。工程

(b)は、たとえば容器内の核酸を含む液体が叙上の再使用可能なサーモスタット要素(とくに、冷却要素)および使い捨て可能な加熱要素の助けにより温度調節処理に付されるときに開始されうる。工程(a)および

(b)のあいだ容器が再使用可能な冷却要素の中に貯蔵され、工程(b)の実行のために、使い捨て可能な加熱要素が容器に導入されるときにこれが起こることが好ましい。もし使い捨て可能な加熱要素が蓋と一体化されるならば、当該加熱要素は工程(a)のあいだすでに容器上に設けられ、加熱処理を加えることができ、核酸を放出したのちも加熱処理の目的で加熱処理を加えることができる。

【0050】配列情報の決定は、原則的に当業者に知られた操作、たとえば工程(b)のうちに、ハイブリダイゼーション反応の過程で製造されるのが好ましい核酸が

決定されうる容器内に反応混合物を移送することによって行なうことができる。1つの可能な実験的な操作としては、ヨーロッパ特許出願公告第0079139号公報に記載されているように、いわゆるサンドイッチ原理が用いられる。この操作では、固体相の支持体に結合しているかまたはすることができる、複製された配列情報の第1の部分に対して相補的なキャップチャー・プローブと、標識され、複製された配列情報の他の部分に対して相補的である検出プローブとが用いられる。プローブと複製された配列情報を含む核酸との複合体の產生により、サンプル中の核酸の存在が示されたとわかる。1つの容器から他の容器への核酸の移送を避けることにより、反応混合物および周囲の汚染の危険性が著しく減少する。さらに、この方法はかなり単純であり、より少ない装置の使用により実行されうる。

【0051】

【発明の実施の形態】図1は加熱要素を一体的に備えた本発明の蓋1を示している。当該蓋はシールされるべき容器の開口の形状に正確に適合される閉じられる部分を有する。当該開口のシールは加熱要素5のためのプラスチックマウント6まで延びている。この加熱要素は、加熱要素のための給電電線4がプラスチックマウントまたはシールの内部にとどまることができ、一端において電気コンタクト2は電源まで充分延びている。

【0052】図2には実際に容器に設けられる蓋が示されている。容器の外形寸法は図2に示されており、これらの寸法は図1に示された蓋に適合するものである。これらの外形寸法は本発明の方法(たとえば増幅方法)の実行に適しているが、とくに当業者によって異なる量の液体に容易に適合させることができる。図中の参照符号7は容器を示している。

【0053】図3にはサンプル調製モジュール17を備えた本発明のシステムが示されている。当該システムは増幅のための核酸を含む液体の調製が実行されることが可能、かつ増幅だけが行なえるものである。この図において、頂部取扱いアーム(蓋取扱いアーム11)は、図1に示された蓋1を掴み、反応容器(使い捨て可能な装置デバイス)上に該蓋を置く。蓋の加熱器への給電のためのコンタクトは、頂部取扱いアームと一体的に形成されている。ピペットユニットおよびピペットチップ(使い捨て可能なチップ13)により、試薬14および/またはサンプル液体15は反応容器7(このばあい使い捨て可能なデバイス12)に搬送されうる。本発明の蓋が使い尽くされると、廃材容器16(waste bin)(頂部を備えた使い捨て可能な固体相)に搬送されることができる。すべての工程は3次元方向(x, y, z)への運動を許し、ピペット工程と搬送工程とが実行されうる装置(たとえば、実験用ロボット)において実行されるのが好ましい。

【0054】図4は、電源8、電気コンタクト2、反応

混合物9を備えたシステムであって、容器7と冷却要素10とを対流により加熱することによって熱伝達されて混合されるシステムを示す説明図である。図5は温度調節処理を含む試験を行なうためのシステムの概略図である。

【0055】実施例1

DNA分析を行うためのシステムの確立

当該システムは57°Cに温度自動調節されているウォーターバスから構成される。

【0056】ウォーターバスの上には孔が形成されたプレート（以下、有孔プレートという）がある距離だけ離間して固定されている。当該有孔プレートは、図2に示されたような反応容器が該反応容器の長さの半分だけが没水しうるように延びている。容器上のリムは、容器が水中に滑り落ちるのを防止している。有孔プレートを受け入れるボアは8mmを超える許容量を有している。この有孔プレートを受け入れるボアのマージンは0.4mm未満である（図2参照）。

【0057】挿入された加熱要素は図1においてその概略が示されている。当該加熱要素は液体が一方の側で金箔を濡らすことができるよう一体化された20μmの厚さの金箔と配線とを組み込んだ射出成形されたプラスチック要素である。

【0058】実施例2

静的な温度勾配の条件下でのDNA分析の実行

(1) サンプルの調製/DNAの単離

ヒト白血球DNAを以下に述べる方法およびキアゲン(Quagen)社(40719ヒルデン、ペー オー ボックス、ドイツ連邦共和国)のQIAamp Blood Kit(カタログ番号29104)を用いてヒト全血から分離した。

【0059】EDTA-抗凝固された全血200μl、プロテナーゼK溶液25μl(19mg/ml)および溶解/結合用緩衝液(lysis/Binding buffer)200μlを2mlのエッペンドルフ容器にピペットで分注した。サンプルをボルテックス(Vortex (登録商標))でただちに振とうし、溶液中*

フォワード(すなわち、上流)

配列番号：1

5'-AGA CAG TAC AGC CAG CCT CA-3'

リバース(すなわち、下流)

配列番号：2

5'-GAC TTC AAA TTT CTG CTC CTC-3'

これらのプライマー対を用いて375bpの長さの増幅されたセグメントをえた。

【0066】つぎの組成のマスターミックス(master mix)

10μl

MgCl₂を含む10倍PCR用緩衝液

(100mM トリス/HCl pH 8.9、500mM KCl、1.5mM MgCl₂)

2μl

10mM dNTP混合物

(すなわち、各10mM dATP、dTTP、dGTP、dCTP およびdTTP)

*に形成されている沈殿物を再懸濁した。サンプルを70°Cで10分間加熱し、室温まで冷却した。イソプロパノール210μlをこの溶液に加えた。えられたサンプルをQIAampのスピンカラム(spin-column)に移送した。このスピンカラムは下方に開放した遠心分離するデバイス/チューブであり、グラスファイバーのフリース(fleece)がその底部に取り付けられている。

【0060】スピンカラムをサンプル収集容器(2mlのエッペンドルフ容器)に挿入し、ベンチトップ型遠心分離器で1分間に6000gで遠心分離した。濁液を捨て、洗浄用緩衝液500μlをスピンカラムにピペットで分注した。そのうち、再び1分間、6000gで遠心分離した。濁液を捨て、洗浄操作を繰り返した。

【0061】その後、溶離溶液(10mMトリス/HCl、1mM EDTA、pH 8.0)200μlをスピンカラムにピペットで分注し、さらなる遠心分離(1分間、6000g)のち結合したDNAをグラスファイバーのフェルトから溶離した。

【0062】精製されたDNAをゲル電気泳動と光度測定法(吸光度が最大で260~280nm)とを用いて特徴付けた。典型的には、吸光係数A260/A270が1.7~1.9(260nmで1000mEの吸光度が50ng/μlのDNAサンプルに対応する)である溶離溶液200μl中の6μgのDNA(1μlあたり約30ngのDNA)が200μlの全血(1mlあたり約5×10個の白血球)からえられた。

【0063】溶離されたDNAのフラグメントの大きさは、ゲル電気泳動(1%アガロースゲル、臭化エチジウム染色)を用いて決定すると1~50Kbpであり、おもに20~40Kbpであった。

【0064】(2) 増幅/DNA複製

ヒトtPA(組織プラスミノーゲンアクチベーター)遺伝子由来の配列を特定の2つのプライマーを用いて増幅した。用いたプライマーの配列はつぎのとおりである。

【0065】

5'-AGA CAG TAC AGC CAG CCT CA-3'

※ermix)を、以下に述べるポリプロピレン製の(PC

CR)反応容器内にピペットで分注した。

【0067】

13	
0. 5 μ l	Taq-ポリメラーゼ (5 U/ μ l)
1 μ l	フォワード・プライマー (30 μ M、配列番号1参照)
1 μ l	リバース・プライマー (30 μ M、配列番号2参照)
82. 5 μ l	高压滅菌され、2回蒸留された蒸留水

【0068】プライマーを除いて増幅に用いられたすべての試薬は、ベーリンガー・マンハイム社製のPCRコア・キット (PCR Core kit、カタログ番号1578-553) を用いた。

【0069】マスターミックスはボルテックス攪拌器上に暫く載せられ、しかるのちにベンチトップ型の遠心分離器で遠心分離された。前記(1)でえられたDNAを含むサンプル3 μ l (約30 ng/ μ lのDNAを含む)をマスターミックスにピペットで分注した。PCR容器を本発明の加熱/冷却ブロック内に取り付け、蓋を含む使い捨て可能な加熱要素によってシールした。

【0070】加熱要素は、抵抗線がPCR用マスターミックス中に経路の約2/3程度延びるように配された。加熱要素は電源に連結され、前記抵抗線が95 °Cの温度を維持しチューブの内壁が58 °Cの温度を達成するよう、PCR用マスターミックスを0.5時間インキュベートした。

【0071】増幅終了後、PCR用マスターミックスを以下の(3)にしたがって分析した。

【0072】(3) 増幅されたDNAの分析

増幅されたPCRサンプル10 μ lを前記(2)項で述べた1%アガロースゲルの適用位置に適用した。ベーリンガー・DNA・レンゲン・スタンダルト (Boehringer DNA Laengen standard) VI (カタログ番号1062-590、フラグメントの大きさ2176~154 bp) 800 ngを適用した。

【0073】ゲルを電界に2時間かけ、紫外線テーブル上で分析した。マスターミックス中のヒト白血球DNAの存在下で、強いDNAのバンド (375 bp) がゲル*

* 中で視認でき、レンゲン・スタンダルトVIの394 bpバンドと298 bpバンドとのあいだに位置づけられた。

【0074】実施例3

温度勾配の経時変化による温度調節処理

10 この試験の目的は本発明のシステムを用いた周期的に変化する温度勾配の決定と最適化である。この目的のために、ポリプロピレン製の、高压滅菌され、2回蒸留された蒸留水300 μ lが充填された試験管が用いられ、当該試験管はペルチェ要素によって冷却された金属製のサーモスタッフブロック内に挿入された。市場で入手しやすいPt24チップは蓋と一体化されている。当該蓋は同時に加熱要素および温度計として機能している。加熱要素は水中に延びている。試験管の近傍で、サーモスタッフブロックの所定の温度がM4011BBC温度検知デバイスを用いて監視された(表1参照)。なお所定の温度とは、各ばあいにおいてサーモスタッフ要素が調節される温度である。試験の構成は図5に示される。ユニットは温度インターバルの変化を用いて動作された。動作時間は加熱が動作される時間間隔として定義され、非動作時間はヒートサイクル間の時間間隔として定義される。この試験の結果は、図6~12に示される。図12によるテスト運転はセンシブルな温度調節処理を促進していないことは明らかである。なぜならば、時間間隔は多分核酸の再ハイブリダイゼーションのために充分長い30 からである。これらのテストにもとづいて、当業者は特定のシステムのための最良の条件(特定の幾何学的特徴、加熱速度など)を決定しうる。

【0075】

【表1】

1

所定の温度(°C)	測定温度(°C)	オン(ms)	オフ(ms)	図
4	4.9	800	2000	図6
10	11.0	400	2000	図7
10	10.6	800	2000	図8
10	11.0	800	3000	図9
10	10.9	800	4000	図10
20	20.2	800	3000	図11
20	20.5	2000	1000	図12

【0076】

【発明の効果】本発明のシステムによれば、温度の調節

回数には関係なく、各ばあいにおいて必要とされるかまたは所望の温度を設定することが可能となる。

【0077】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列：

AGACAGTACA GCCAGCCTCA

【0078】配列番号：2

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列：

GACTTCAAAT TTCTGCTCCT C

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例の加熱要素を一体的に備えた蓋を示す図である。

【図2】図1の蓋が容器に取り付けられた状態を示す図である。

【図3】本発明のシステムの一実施例を示す概略説明図である。

【図4】本発明のシステムの一実施例を示す概略説明図である。

【図5】温度調節処理を含む試験を行なうためのシステムを含む概略説明図である。

【図6】試験結果を示すグラフである。

*

※ トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：他の核酸 合成DNA（プライマー）

配列の特徴：／d e s c オリゴデソキシリボヌクレオチ

*

★ 【図7】試験結果を示すグラフである。

【図8】試験結果を示すグラフである。

【図9】試験結果を示すグラフである。

【図10】試験結果を示すグラフである。

【図11】試験結果を示すグラフである。

【図12】試験結果を示すグラフである。

【符号の説明】

1 蓋

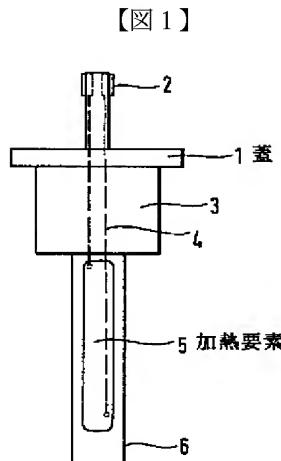
5 加熱要素

7 容器

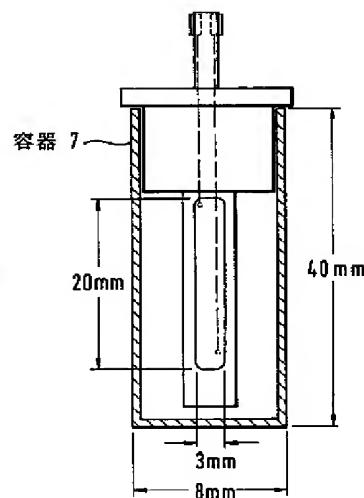
10 冷却要素

12 使い捨て可能なデバイス

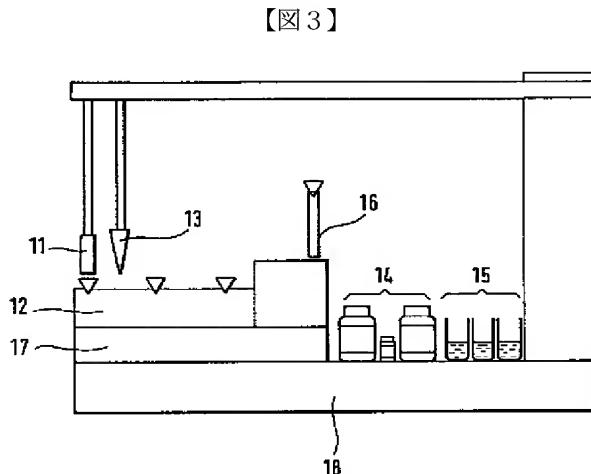
★



【図1】



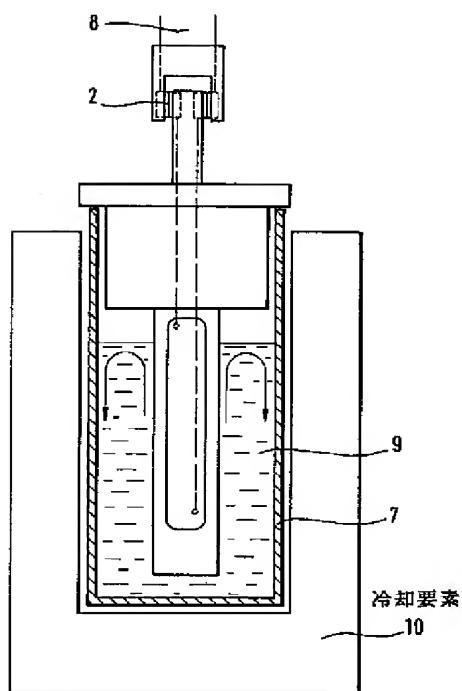
【図2】



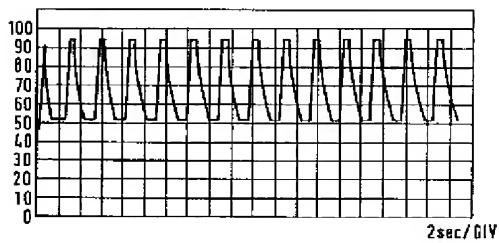
【図3】

12 使い捨て可能なデバイス

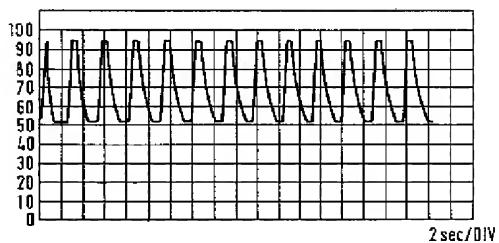
【図4】



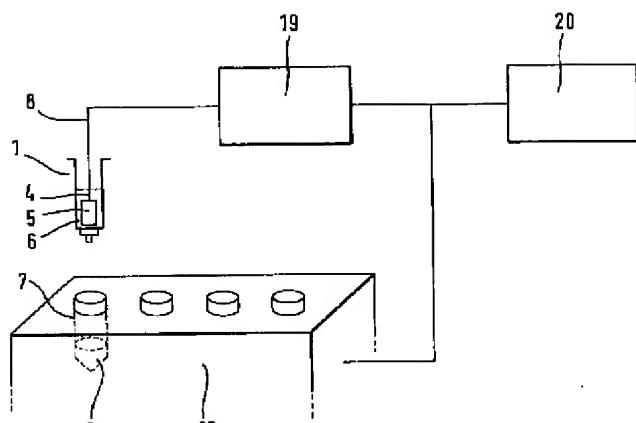
【図6】



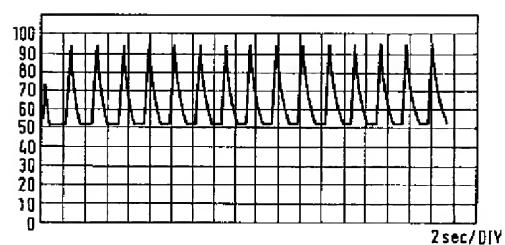
【図8】



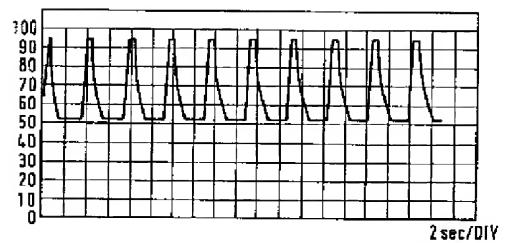
【図5】



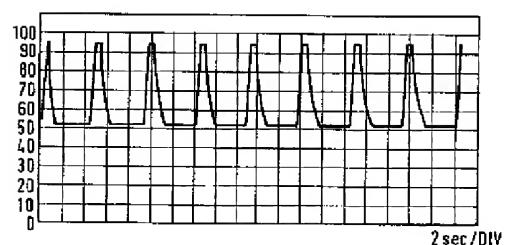
【図7】



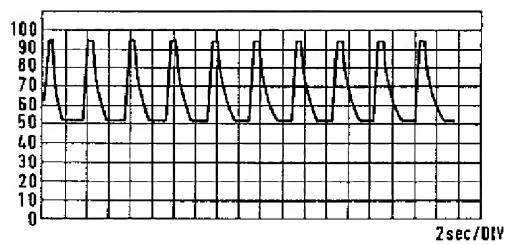
【図9】



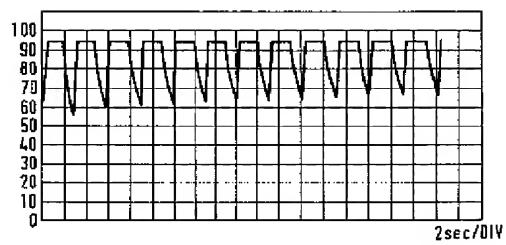
【図10】



【図11】



【図12】



フロントページの続き

(72)発明者 ゲルハルト ピエンハウス
ドイツ連邦共和国、デー-82407 ビーレ
ンハイム、カルベンデルシュトラーセ 1